

# 学 位 論 文 要 旨

学位論文題名

サンドイッチ培養肝細胞を用いた尿酸肝動態の解析

---

英題

Modeling analysis of hepatic disposition of uric acid using sandwich-cultured human hepatocytes

---

専攻: 薬学

研究室: 薬物動態学

氏名: 和田 翔

主任指導研究員氏名: 玉井 郁巳

## **【Abstract】**

[Background] Serum uric acid levels are often involved with serious disorders such as gout, renal failure, cardiovascular disease and non-alcoholic fatty liver disease. Hence it is important to elucidate regulation mechanism of uric acid in human. Uric acid is produced from purines by xanthine oxidase (XO) mainly in liver, and is excreted into urine and feces. Although there are many studies on transporters which regulate renal and intestinal handling of uric acid, transporters for hepatic handling of uric acid remains unclear. Accordingly, we conducted a modeling analysis of uric acid combined with its precursors in liver using human sandwich-cultured hepatocytes (hSCH) to elucidate hepatic uric acid disposition.

[Methods] The metabolic, basolateral efflux, uptake, and hepatobiliary efflux of uric acid-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N (UA), xanthine-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N (XA), and hypoxanthine-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N (HX) by hSCH were investigated using mathematical models of their disposition. Isotope-labeled HX was used to separately analyze from endogenous uric acid and its precursors. HX and its metabolites XA and UA in cells and medium were measured by LC-MS/MS. Benzbromarone, MK571, and furosemide were used for inhibitors of GLUT9, MRP4, and MRP4/NPT4 respectively.

[Results] Time courses for HX, XA and UA in the cells, outer medium and bile canalicular lumen of hSCH were measured and analyzed by three compartment model to obtain rate constant of cellular uptake, metabolism and efflux into bile canalicular lumen and outer medium. Based on observed changes of rate constants by transporter inhibitors, it was suggested that canalicular efflux of UA was negligible and sinusoidal efflux was mainly mediated by GLUT9 and MRP4. Furthermore, it was predicted that inhibition of sinusoidal efflux transporters does not lower serum uric acid level until significant reduction to less than 10% of control, since sinusoidal efflux was very efficient and other processes such as production XA and UA, supply of HX from outer medium and XA efflux are more sensitively affecting UA in outer medium.

[Conclusion] Based on the present modeling analysis of hepatic disposition of XA, HX and UA in hSCH, quantitative contribution of sinusoidal efflux transporters were successfully elucidated in human.

## 【背景・目的】

血清尿酸値 (serum uric acid: SUA) の基準値は男性が 3.7-7.0 mg/dL、女性が 2.5-7.0 mg/dL であり、SUA が 7 mg/dL を超えると高尿酸血症と診断される。尿酸濃度 7 mg/dL (417  $\mu$ M) は尿酸の飽和溶解度であり、この値を超えることで尿酸は結晶化し、関節や尿細管中に析出することで痛風や腎障害を引き起こす。また、メタボリックシンドローム、高血圧や非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) などの疾患とも関連性が示唆され、SUA の変動は痛風のみならず他の疾患を誘発する危険性がある。一方、尿酸は生理的作用として、抗酸化作用を有している。近年ではパーキンソン病、アルツハイマー病や多発性硬化症の防御因子として報告されている。尿酸は、分子量 168.1 g/mol、オクタノール・水分配係数の自然対数 ( $\log P$ ) -1.1 と低分子かつ水溶性の内因性物質である。また、その酸解離定数 ( $pK_a$ ) は、5.6 であり生理的 pH7.4 付近において、ほとんどがイオン形として存在しているため尿酸の細胞膜透過過程にはトランスポーターの介在が必須である。実際に、近年のゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) によって、高尿酸血症及び痛風の関連遺伝子としてトランスポーターである glucose transporter (GLUT9)、breast cancer resistance protein (BCRP)、multidrug resistance associated protein (MRP) 4、 $Na^+$ -phosphate cotransporter (NPTs)、organic anion transporter (OAT)、urate transporter (URAT)1 などが報告されている。

尿酸は主に肝臓でキサンチンオキシダーゼ (XO) により合成され、腎臓や消化管を経て尿中や糞中へ排泄される。これまでに、腎臓や消化管での尿酸の排泄や再吸収を介して血清尿酸値に影響するトランスポーター分子が明確になってきている。一方、肝臓にも尿酸輸送活性を有するトランスポーターが発現するが、各分子の寄与・重要性は明らかではない。肝臓の尿酸輸送に関与するトランスポーターの候補として、sinusoidal 側では肝臓に発現が認められ、かつ細胞外へと輸送が報告されている GLUT9、NPTs 及び MRP4 が考えられる。また、胆管腔側では BCRP が関与すると考えられる。

肝臓における化合物の動態を決定する因子である、肝取り込み、肝臓から血液への排出、胆汁中排出及び代謝を評価する *in vitro* の実験系はいくつか報告されている。その中で、サンドイッチ培養肝細胞のみが、化合物の胆汁中排泄、細胞への取り込み、基底膜側からの排泄及び代謝を同時に評価可能である。

サンドイッチ培養法は、単層培養法と比べてより長期間細胞を培養できる点や、薬物代謝酵素活性を良好に維持できる利点があり、酵素誘導試験や、肝細胞障害性試験等にも利用される。さらに、サンドイッチ培養肝細胞では細胞間を密着させる tight junction が形成されることで、極性が回復して胆管腔が形成されるとともに、排泄トランスポーターが局在化することが報告されている。また、胆管腔を維持するために必要な tight junction 機能を  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  存在の有無によって調節しながら薬物の取り込み試験を行い、胆管腔中排出を評価できる手法として利用されている。 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  存在下では tight junction が維持されるため、(細胞質+胆管腔) の薬物量が得られ、 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  非存在下

では胆管腔の **tight junction** の開口により（細胞質のみ）の薬物量が得られる。よって、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下の取り込み量から  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 非存在下の取り込み量を差し引くことにより、胆管腔に移行した薬物量を得ることができる。

当研究室では、サンドイッチ培養肝細胞を用いて、**mycophenolic acid (MPA)**及びその代謝物である **mycophenolic acid phenol glucuronide** の胆汁中排泄、肝細胞への取り込み、血液側への排出を数理的モデル解析し、各過程を定量的に評価できることを示している。そこで本研究では、サンドイッチ培養肝細胞を用いて、肝臓での尿酸生成に至る代謝反応、肝細胞への取り込み、肝細胞から **medium** 中への排出及び胆管腔中への排出を、数理的モデル解析により検討することで、各輸送体の寄与を定量的に評価し、尿酸の肝動態全体を明らかにすることができないかと考えた。なお、肝細胞には内因性の **hypoxanthine**、**xanthine** 及び **uric acid** が存在するため精度高く定量解析が行えない。そこで、それらと区別するために安定同位体の **hypoxanthine- $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$  (HX)** を使用し、**XO** により **xanthine- $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$  (XA)** 及び **uric acid- $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$  (UA)** が生成する代謝過程、および尿酸の胆管腔中と血液中への輸送過程を評価することとした。なお、以後安定同位体標識体をそれぞれ **HX**、**XA** 及び **UA** と表記する。

## 【方法】

### ヒト肝細胞のサンドイッチ培養

凍結肝細胞を  $37^{\circ}\text{C}$  で融解し、**cryopreserved hepatocyte recovery medium** に懸濁、遠心後 ( $50\text{ g}$ ,  $10\text{ min}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ )、沈殿した細胞を  $7 \times 10^5$  になるように **cryopreserved hepatocyte plating medium** で懸濁した。得られた細胞懸濁液を **collagen I-coated 24 well plate** (**BioCoat**, **BD biosciences**) に  $500\ \mu\text{L}$  播種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  下で約 4 時間培養し、その後、 $350\ \mu\text{g}/\text{mL}$  **geltrex** を含む **Williams' E medium** に培地を交換し、サンドイッチ培養を行った。以後は、約 24 時間ごとに **Williams' E medium** に培地交換した。

### 尿酸動態測定試験

$24\text{-well plate}$  に播種したサンドイッチ培養ヒト肝細胞を  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  **medium** 又は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free **medium** で 5 分間プレインキュベーションした。その後、 $10\ \mu\text{M}$  **HX** を含む  $500\ \mu\text{L}$  の **medium** に交換した。所定時間ごとに、**medium** を  $150\ \mu\text{L}$  回収した後、氷冷した **medium** で二回洗い、 $200\ \mu\text{L}$  の  $0.002\%$  **triton-X (Wako)** で細胞を溶解させ、細胞溶解液を  $150\ \mu\text{L}$  採取した。また、 $20\ \mu\text{L}$  をタンパク定量用に回収した。**HX**、**XA** 及び **UA** を **LC-MS/MS** により定量した。

トランスポーター阻害剤の **benzbromarone (BEZ)** (**GLUT9** 阻害剤)、**MK571** (**MRP4** 阻害剤)、**furosemaide (FUR)** (**MRP4/NPT4** 阻害剤)、**para-aminohippuric acid (PAH)** (**NPT1** 阻害剤)、**buromsulfophthalein (BSP)** (**OATPs** 阻害剤)及び **XO** の阻害剤の **allopurinol (ALO)** は **HX** と同時に処理した。

### モデリング解析

HX、XA 及び UA の medium 中、細胞中及び胆管腔中の経時的な量変化に対するモデルにおける一時速度定数を Napp nonlinear regression analysis program (version 2.3.1 for Macintosh OS-X; The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan)によって解析した。

HX、XA 及び UA の medium 中及び細胞中の継時的な量的変化から standard model では、以下の微分方程式によって一次速度定数を算出した。

$$dX_{HX, \text{Medium}} / dt = -k_{HX, \text{Uptake}} \times X_{HX, \text{Medium}}$$

$$dX_{HX, \text{Cell}} / dt = k_{HX, \text{Uptake}} \times X_{HX, \text{Medium}} - (k_{HX, \text{Metabolism}} + k_{HX, \text{Bile}}) \times X_{HX, \text{Cell}}$$

$$dX_{HX, \text{Bile}} / dt = k_{HX, \text{Bile}} \times X_{HX, \text{Cell}}$$

$$dX_{XA, \text{Medium}} / dt = k_{XA, \text{Efflux}} \times X_{XA, \text{Cell}}$$

$$dX_{XA, \text{Cell}} / dt = k_{HA, \text{Metabolism}} \times X_{HX, \text{Cell}} - (k_{XA, \text{Metabolism}} + k_{XA, \text{Efflux}} + k_{XA, \text{Bile}}) \times X_{XA, \text{Cell}}$$

$$dX_{XA, \text{Bile}} / dt = k_{XA, \text{Bile}} \times X_{XA, \text{Cell}}$$

$$dX_{UA, \text{Medium}} / dt = k_{UA, \text{Efflux}} \times X_{UA, \text{Cell}}$$

$$dX_{UA, \text{Cell}} / dt = k_{XA, \text{Metabolism}} \times X_{XA, \text{Cell}} - (k_{UA, \text{Efflux}} + k_{UA, \text{Bile}}) \times X_{UA, \text{Cell}}$$

$$dX_{UA, \text{Bile}} / dt = k_{UA, \text{Bile}} \times X_{UA, \text{Cell}}$$

一次速度定数の  $k_{\text{Uptake}}$ 、 $k_{\text{Bile}}$  及び  $k_{\text{Efflux}}$  はそれぞれ、medium 中から細胞中への取り込み、胆管腔中への排出及び細胞中から medium 中への排出を示す。また、 $k_{\text{Metabolism}}$  は細胞内の代謝を示す。X は HX、XA 及び UA の各コンパートメントにおける量を表す。

Store model では、以下の微分方程式によって一次速度定数を算出した。

$$dX_{HX, \text{Medium}} / dt = -k_{HX, \text{Uptake}} \times X_{HX, \text{Medium}}$$

$$dX_{HX, \text{Store}} / dt = k_{HX, \text{Uptake}} \times X_{HX, \text{Medium}} - k_{HX, \text{Store Uptake}} \times X_{HX, \text{Store}}$$

$$dX_{HX, \text{Cell}} / dt = k_{HX, \text{Store Uptake}} \times X_{HX, \text{Medium}} - (k_{HX, \text{Metabolism}} + k_{HX, \text{Bile}}) \times X_{HX, \text{Cell}}$$

$$dX_{HX, \text{Bile}} / dt = k_{HX, \text{Bile}} \times X_{HX, \text{Cell}}$$

$$dX_{XA, \text{Medium}} / dt = k_{XA, \text{Efflux}} \times X_{XA, \text{Cell}}$$

$$dX_{XA, \text{Cell}} / dt = k_{HA, \text{Metabolism}} \times X_{HX, \text{Cell}} - (k_{XA, \text{Metabolism}} + k_{XA, \text{Efflux}} + k_{XA, \text{Bile}}) \times X_{XA, \text{Cell}}$$

$$dX_{XA, \text{Bile}} / dt = k_{XA, \text{Bile}} \times X_{XA, \text{Cell}}$$

$$dX_{UA, \text{Medium}} / dt = k_{UA, \text{Efflux}} \times X_{UA, \text{Cell}}$$

$$dX_{UA, \text{Cell}} / dt = k_{XA, \text{Metabolism}} \times X_{XA, \text{Cell}} - (k_{UA, \text{Efflux}} + k_{UA, \text{Bile}}) \times X_{UA, \text{Cell}}$$

$$dX_{UA, \text{Bile}} / dt = k_{UA, \text{Bile}} \times X_{UA, \text{Cell}}$$

一次速度定数の  $k_{HX, \text{Uptake}}$  及び  $k_{HX, \text{Store Uptake}}$  は HX の取り込み過程を示す。

## 【結果】

サンドイッチ培養ヒト肝細胞に HX を処理後 XA 及び UA が経時的に産生された。また、HX、XA 及び UA の medium 中、細胞中及び胆管腔中の経時的な量変化を standard model で解析した。Medium 中及び胆管腔中の HX、XA 及び UA 量は概ね予測値と実測

値が相関したが、細胞内の HX、XA 及び UA 量の時間推移が適切に見積もることができなかつた。そこで、細胞内量の誤差を改善するために HX の取り込み過程にさらに 1 つコンパートメントを加え、store model を構築した。Store model に基づいて予測された、medium 中の XA 及び UA の量的推移は standard model 同様に、実測値と概ね一致した。また、細胞中の HX、XA 及び UA の量も予測値と実測値が概ね一致した。以後、Store model により各速度定数を見積もることとした。その結果、算出した  $k_{UA, Efflux}$  が  $k_{UA, Bile}$  と比較して約 88 倍であり、合成された UA は胆管腔中よりも medium 中に排出されることが示された。

Store model により算出した各一時速度定数の変化に対する medium 中、細胞中及び胆管腔中の UA 量の感受性をシミュレーションした結果、medium 中の UA 量は  $k_{UA, Efflux}$  を 10 倍にした場合ほとんど変化せず、10%まで低下させたときでも減少は 74%まで程度であった。一方、細胞中及び胆管腔中の UA 量は、 $k_{UA, Efflux}$  を 10 倍にした場合、両方とも 10%に減少した。また、 $k_{UA, Efflux}$  を 10%まで低下させたときそれぞれ 886%及び 741%に増加した。さらに、算出した速度パラメータを 10 倍及び 1/10 に変化させた際に、medium 中の UA 量に感受性が高かったのは  $k_{HX, Uptake}$ 、 $k_{XA, Metabolism}$  及び  $k_{XA, Efflux}$  であった。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて HX、XA 及び、UA の経時的量変化に対する XO 阻害剤である allopurinol (10  $\mu$ M)の影響を検討した。モデル解析により、ALO 存在下の際のパラメータを算出した。ALO 存在下では、コントロールと比較して HX 及び XA の代謝速度定数が、それぞれ、約 5.1%及び約 1.9%まで減少した。

尿酸トランスポーター阻害剤である BEZ、MK571、FUR、PAH 及び BSP を HX と同時にサンドイッチ培養ヒト肝細胞に処理し、HX、XA 及び UA 量の経時的変化を数理的モデルにより解析した。 $k_{UA, Efflux}$  は BEZ > MK571 > FUR > BSP  $\approx$  PAH の順で阻害された。

## 【考察】

Store model により算出した  $k_{UA, Efflux}$  が  $k_{UA, Bile}$  と比較して大きい値であり、合成された尿酸は、主に肝細胞から血液側に排泄され、胆管腔中への排泄は僅かであることが考えられた。このことは、ヒト及び齧歯類の尿酸の胆管腔中への排泄クリアランスは腎臓や消化管への排泄クリアランスよりも小さいことが報告されていることと一致する。数理的モデルによる尿酸量のシミュレーションにおいて、XO による代謝過程、HX の取り込み過程及び XA の細胞外 medium 中への排出過程の変化は、血中尿酸量に対応する細胞外 medium 中 UA 量を受容性高く変動させたが、UA の細胞から細胞外 medium 中への排出過程の変動に対して感受性は低かった。したがって、肝臓血管側膜尿酸輸送が多少変化しても血清尿酸値への影響は小さいと考えられた。

XO 阻害剤の ALO によって XA ならびに UA の産生速度定数 ( $k_{XA, Metabolism}$ 、 $k_{UA}$ 、

Metabolism) が減少したことから hSCH においても XO の評価が可能であることが示された。また、トランスポーターの阻害試験の結果から、細胞中から medium 中への排出速度定数の  $k_{UA, Eflux}$  が BEZ 及び MK571 で 95% 及び 81% 阻害されたため、GLUT9 ならびに MRP4 の寄与が大きいことが考えられた。また FUR、PAH 及び BSP においても  $k_{UA, Eflux}$  が 45-56% 阻害されたことから NPTs など他の輸送体も細胞中から medium 中への排出に一部関与していることが考えられた。

### 【結論】

尿酸はヒト肝臓において主に GLUT9 ならびに MRP4 を介して血液側に排出されることが示された。肝臓の hypoxanthine の取り込み、XO による xanthine から尿酸への代謝過程は SUA に大きく影響を与えるが、トランスポーター活性の調節による肝細胞内から血液側への排出制御は SUA への影響が小さいことが示された。以上、hSCH において尿酸の肝動態を評価するツールとして数理的モデル解析は有用であると示された。

## 審査結果の要旨

高尿酸血症は痛風をはじめとする多様な慢性疾患と関連することから、その管理が臨床的に必要である。尿酸は主に肝臓において生合成され、血中に移行し、尿中および消化管腔中に排泄され、そのバランスによって血清尿酸値は維持される。現在までに多様な生体側因子に関する研究がなされ、腎臓における URAT1 や GLUT9 などのトランスポーターや消化管分泌における BCRP トランスポーターが血清尿酸値調節因子として同定されている。一方、尿酸が生合成される肝臓から血中への移行機構については、複数のトランスポーターの関与が推定されているが、詳細は不明なままであった。本論文では尿酸の主たる生合成部位となる肝臓における尿酸動態について生合成と膜輸送の両者に着目し、各因子の寄与を定量的に解析することを目的とした。サンドイッチ培養ヒト肝細胞が、代謝過程と胆管腔側および血液側への膜輸送を同時に評価できることを利用し、Hypoxanthine の安定同位体を用いた Xanthine および尿酸の生合成およびそれらの膜透過性を、内因性化合物と区別した解析を行った。細胞内外および胆管腔中を異なるコンパートメントとし、標識 Hypoxanthine を投与後の各部位での経時的濃度測定に基づいて、代謝・膜輸送過程をモデル化した。さらに、Xanthine oxidase と 5 種の尿酸トランスポーターに対する阻害薬存在下において各過程の速度定数の変動を見積もった。その結果、肝動態を左右する律速因子ならびに生成した尿酸を血液中に輸送する各トランスポーター分子の寄与を定量的に解析することができた。本研究は、新しい尿酸動態解析手法を提唱するとともに、肝の各尿酸動態影響因子を定量的に提示する臨床的意義を有しており、またその成果学術論文として専門雑誌への掲載にも至っていることから博士(薬学)論文に値するものと判定された。